

トラマメ α -アミラーゼインヒビターの消化酵素に対する安定性

澤田小百合, 田中 早苗, 團 邦子, 田代 操
(武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科)

Stability of an α -amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris* cultivar Tora toward digestive enzymes

Sayuri Sawada, Sanae Tanaka, Kuniko Dan, Misao Tashiro

Department of Food Science and Nutrition,
School of Human Environmental Sciences,
Mukogawa Women's University, Nishinomiya 633-8558, Japan

The stability of the α -amylase inhibitor (TAI) from Toramame (*Phaseolus vulgaris* L.) toward the attack of proteolytic enzymes (pepsin, trypsin and chymotrypsin) was examined by estimating the inhibitory activity, SDS-PAGE and immunoblot of the digests.

TAI showed strong resistance against pepsin or trypsin, and was not damaged. On the other hand, TAI was unstable toward chymotrypsin attack to cause the gradual loss of the α -amylase inhibitory activity. The presence of BSA in the digestion mixture prevented the TAI degradation and was accompanied with a protection of the activity.

These findings suggest that TAI is protected to some extent against chymotrypsin digestion when ingested with a food protein.

諸 言

インゲンマメ類の種子中には、タンパク質性の阻害物質である α -アミラーゼインヒビター (AI) が存在することが古くから知られている^{1)~8)}。本インヒビターは、動物起源の α -アミラーゼを特異的に阻害することから、従来より消化機能妨害因子とされてきた。しかし AI は、エネルギーの相対的摂取過剰な生活など生活習慣の乱れの多い現代において、従来の抗栄養物質とは逆の新たな展開を迎えている。即ち、糖尿病が我国において国民病とも言えるほど蔓延し、深刻な社会問題になっていることから、糖質消化抑制作用を有する AI が 2 型糖尿病⁹⁾¹⁰⁾や、肥満¹¹⁾の予防と治療に有効な食品中の機能性

因子として評価されつつあり、その利用に大きな関心が寄せられている。しかしながら、実際に AI の実用化を可能にするためには、本物質を生体内でより機能し易くすることが必要であり、そのためには構造と機能についての詳細な理解が求められる。

著者らは、8 品種のインゲン属のマメ種子より 8 種の同族の AI を分離精製し、そのうちトラマメ、オオフクマメ、ムラサキハナマメの AI (TAI, DAI, MAI-2) について、タンパク質レベルでその一次構造及び糖鎖構造を明らかにしている¹²⁾。また、ウズラマメ α -アミラーゼインヒビター (UAI) 及びシロハナマメ α -アミラーゼインヒビター (SAI-2) の一次構造は、ペプチドマップ法によりそれぞれ TAI 及び MAI-2 と同一であると結論している¹³⁾¹⁴⁾。

一方, AI を機能性食品因子としてヒトに応用する場合, AI を摂取後, 種々のタンパク質分解酵素による消化性など, 体内での AI の挙動について検討しておく必要がある.

本報では, 構造の明らかな TAI について種々のタンパク質分解酵素を用い, *in vitro* 消化実験を行い, AI を摂取した場合の消化酵素に対する安定性をインヒビター活性, SDS-PAGE とウエスタンブロッティング後の酵素抗体法により検討した.

実験方法

1. 供試料

トラマメ α -アミラーゼインヒビター (TAI) は, 北海道産のトラマメ (*Phaseolus vulgaris* L.) から既報¹⁵⁾に従い精製した.

2. 酵素及び阻害活性測定法

AI 活性は, 標的酵素としてブタ膵臓 α -アミラーゼ (Type 1-A, Sigma 社) を, 基質としてアミラーゼ定量用可溶性デンプン (ナカライテスク社) を用いてジニトロサリチル酸 (DNS) 法により測定した. 即ち, 50 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.05% Triton X-100 を含む 10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に酵素 (1.0×10^{-8} M) あるいは酵素とインヒビターを加えた反応液 0.5 ml を 37℃ で 1 時間プレインキュベーションした後, 50 mM NaCl, 0.05% Triton X-100 を含む 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 6.9) で調製した 1% 可溶性デンプン溶液 0.5 ml 加えて 5 分間反応させた. DNS 試薬 1.0 ml を加えて反応を停止させた後, 沸騰水浴中で 5 分間煮沸した. 冷却した後, 蒸留水 10 ml を加えて希釈し, 520 nm における吸光度を測定した. 酵素活性は酵素を含まないものをブランクとして酵素を作用させたものとの吸光度の差で表した. また, インヒビター活性はインヒビター存在下における残存酵素活性から算出した.

3. 抗体の調製

TAI に対するポリクローナル抗体の調製は, TAI を当量の不完全 adjuvant と混合し乳化状にした後, 2 mg/ウサギの量で, 2 週間隔で 3 回, 雄のウサギの皮内に注射した. 最後の注射の 1 週間後に採血し血清を集めた. 集めた血清と同量の飽和硫酸アンモニウム溶液を加えて塩析した後遠心分離 (10,000 rpm, 30 min, 4℃) し, 沈殿を集めた. 更に, TAI を結合した Sepharose 4B カラムを用いたアフィニティー

クロマトグラフィーにより, TAI に対するポリクローナル抗体を精製した. また, アガロースゲルを用いたオクタロニー法¹⁶⁾を行い, TAI に対する特異的抗体作成を確認した.

4. SDS 電気泳動

SDS 電気泳動は, Laemmli¹⁷⁾の方法に従い 15% (パジェル NPU-15L, アトー社) 又は 19% ポリアクリルアミドゲルを用いて行った. 分子量マーカーは, Low キャリブレーションキット (Amersham pharmacia biotech 社), Prestained Protein Marker, Broad Range (NEW ENGLAND Bio Labs 社) を用いた. 泳動後の染色には, シルベストステイン PAGE タンパク質用キット (ナカライテスク社), クマシーブリリアントブルー R250 を用いた.

5. ウエスタンブロッティング及び酵素抗体法

SDS 電気泳動により分離したタンパク質は, Towbin¹⁸⁾らの方法に従い, PVDF 膜に電気泳動的に転写した後, 酵素抗体法によりインヒビターのバンドを検出した. 即ち転写膜は, 120 倍に希釈した一次抗体と反応後, 二次抗体として 4000 倍に希釈した Anti-Rabbit IgG (FC), AP Conjugate (Promega 社) を用い, Western Blue Stabilized Substrate (Promega 社) にて染色した.

6. *in vitro* 消化

ペプシン消化は, 0.05% Triton X-100 を含む 50 mM グリシン-塩酸緩衝液 (pH 3.0) 中でインヒビター (1×10^{-6} M) とペプシンをモル比 10:1 で 37℃ にてインキュベートした. 一定時間毎 (0.5, 1, 2, 4, 8, 24 時間) に 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) の入ったマイクロチューブに一部を取りペプシンの作用を止めた. 反応溶液は, 一部を 50 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.05% Triton X-100 を含む 10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で希釈し, 残存するインヒビター活性を測定した. 残りの反応溶液は電気泳動分析に供した.

トリプシン, キモトリプシン消化は, 0.05% Triton X-100 を含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) 中で, インヒビター (1×10^{-6} M) とそれぞれの酵素をモル比 10:1 でインキュベートした後一定時間毎に一部を取り, 50 mM 塩酸 (pH 2.0) にて酵素の作用を止めた. 反応溶液については, ペプシン消化同様残存するインヒビター活性の測定及び電気泳動分析を行った. 尚, コントロールは, インヒビターと緩衝液を加えたものについて同様の操作を行っ

た. また, タンパク質存在下におけるキモトリプシン消化は, 反応溶液中にウシ血清アルブミン (BSA, fraction V ナカライテスク社) が 1% 濃度になるように加えた. ペプシン, トリプシン, キモトリプシンは, 何れもシグマ社製を用いた.

実験結果及び考察

1. タンパク質分解酵素に対する TAI の安定性

TAI のタンパク質分解酵素に対する安定性を検討した. 安定性の評価には, インヒビター活性及び SDS-PAGE を用いた. それぞれの結果を Fig.1 及び Fig.2 に示す.

ペプシン消化では, TAI のインヒビター活性は非

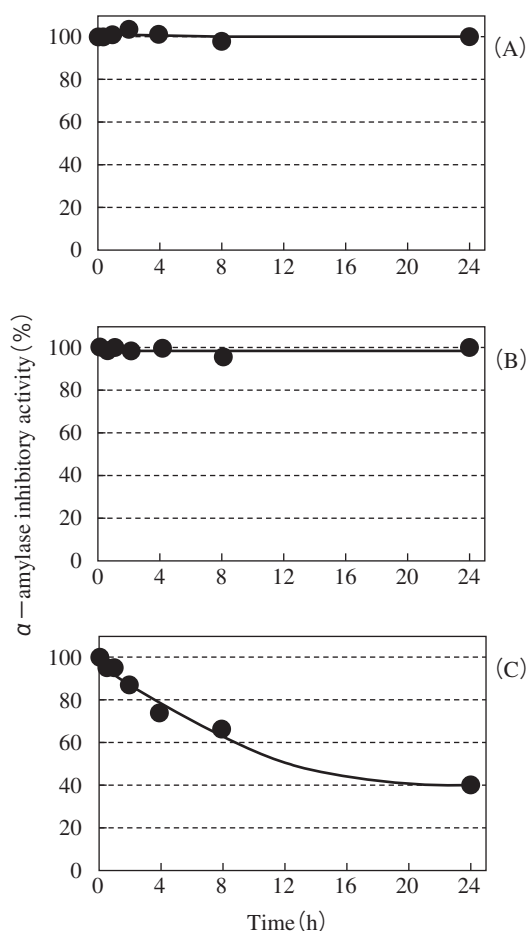


Fig. 1. Effect of *in vitro* digestion by (A) pepsin, (B) trypsin or (C) chymotrypsin on the α -amylase inhibitory activity of TAI.

常に安定であり, 24 時間消化後も活性の低下は認められなかった. また, SDS-PAGE においても TAI は, 14 kDa ~ 20 kDa に複数のインヒビターの明瞭なバンドが認められ, 24 時間消化後も分解は認められなかった. 尚, TAI は, α と β の 2 種の糖タンパクサブユニットから成りテトラマー構造を有している. SDS-PAGE を行くと少なくとも 4 本のバンドとして検出されるが, これは糖鎖の異なるグリコフォームの存在のためである. トリプシン消化では, ペプシン消化同様 TAI のインヒビター活性は安定であり, 24 時間消化後も活性の低下は認められなかった. また, SDS-PAGE においても, 24 時間消

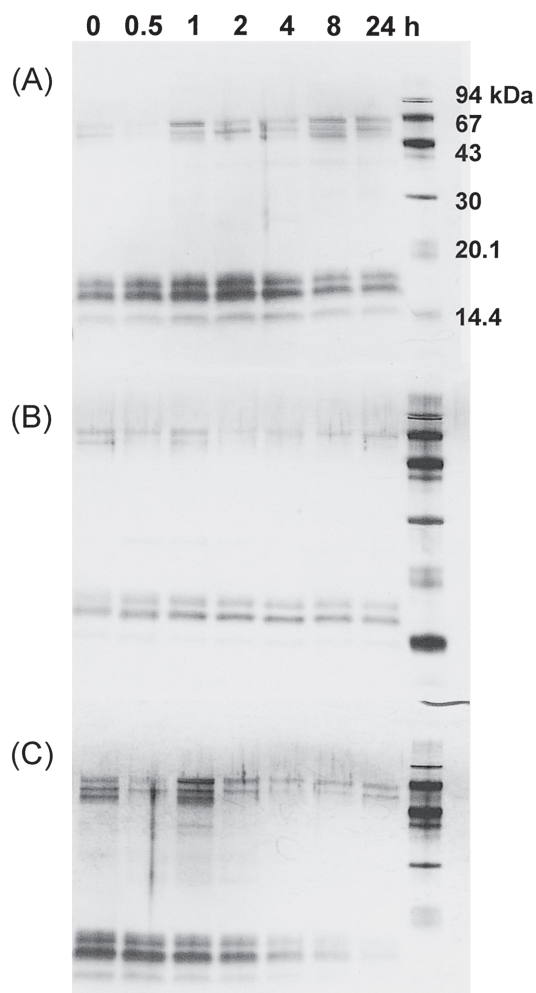


Fig. 2. SDS-PAGE pattern of TAI digested by (A) pepsin, (B) trypsin or (C) chymotrypsin. Silver stain was used.

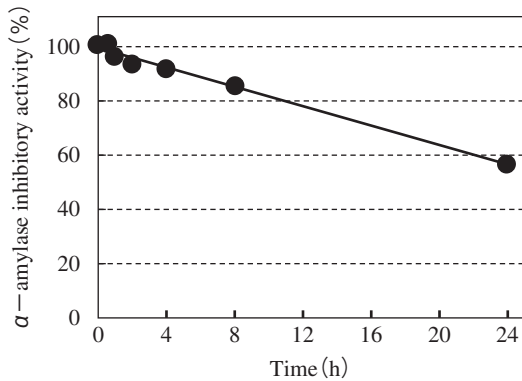


Fig. 3. Effect of *in vitro* chymotrypsin digestion in the presence of BSA on the α -amylase inhibitory activity of TAI.

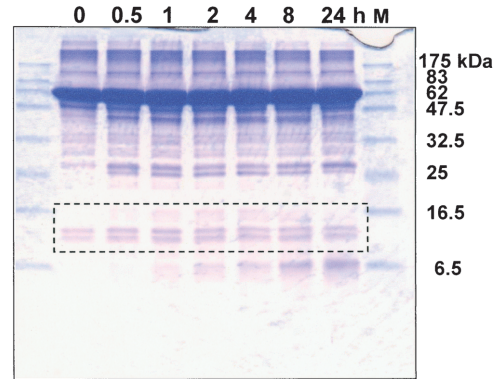


Fig. 4. SDS-PAGE pattern of TAI digested by chymotrypsin in the presence of BSA. Coomassie brilliant blue R-250 was used for the stain of gel.

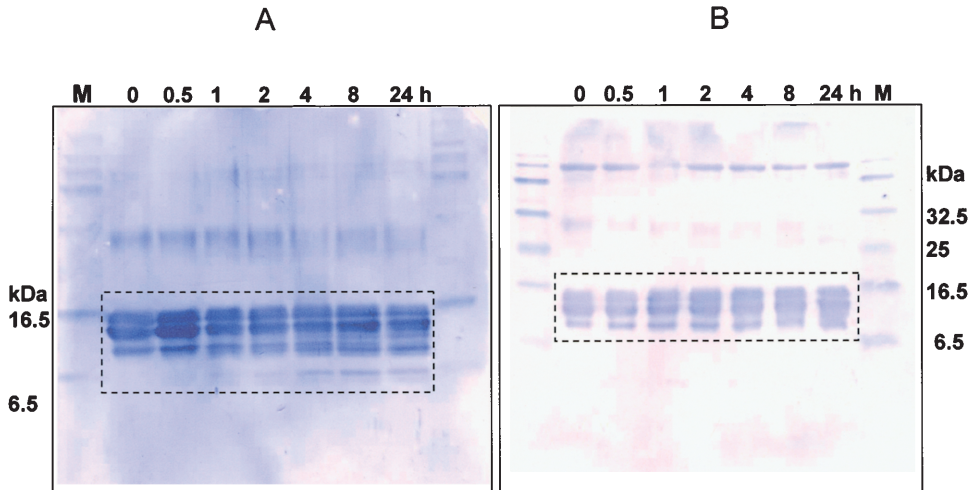


Fig. 5. Immunoblot of the chymotrypsin digests of TAI.
A; chymotrypsin digestion in the absence of BSA.
B; chymotrypsin digestion in the presence of BSA.

化後も明瞭なインヒビターのバンドが確認され分解は認められなかった。TAIは、ペプシン消化、トリプシン消化に対して強い抵抗性を有しており、安定であると考えられた。

一方、キモトリプシン消化では、インヒビター活性は、緩やかではあるが反応時間経過にともなって低下した。2時間消化で約90%に低下し、4時間消化で約75%、8時間消化で約70%、24時間消化で約40%に低下した。また、SDS-PAGEの結果においても反応経過時間毎に徐々にインヒビターのバンドが消失していく様子が認められた。インヒビター

のバンドは、8時間消化でかなり薄くなり、24時間消化でほぼ消失した。TAIは、キモトリプシン消化に対して不安定であることが認められた。

2. タンパク質存在下でのキモトリプシン消化に対する安定性

TAIがキモトリプシン消化に対して不安定であったため、タンパク質(BSA)存在下でのキモトリプシン消化に対する安定性を検討した。インヒビター活性及びSDS-PAGEの結果をFig.3, Fig.4に示す。

インヒビター活性は、反応経過時間毎に低下したが、TAI単独での消化(Fig.1C)に比べると活性の低

下は明らかに軽減されていた。8時間消化で約85%、24時間消化で約60%活性を保持していた。一方、SDS-PAGEでは、インヒビターのバンドは、24時間消化後も消失しなかった。しかし、反応経過時間毎にインヒビターのバンドより低分子側に複数のバンドが認められた。これら低分子側のバンドは、BSAの分解物と考えられるが、更にBSA存在下におけるTAIの挙動を確認するために、SDS-PAGE後ウエスタンブロッティングを行い、酵素抗体法によりインヒビターのバンドを検出した。結果をFig.5に示す。インヒビター単独での消化では、反応経過時間毎にインヒビターのバンドは低分子化される様子が認められた(Fig.5A)。一方、タンパク質存在下ではインヒビターのバンドに大きな変化は認められず、24時間消化においてのみ僅かに分解が認められた(Fig.5B)。また、SDS-PAGEで認められた6.5 kDa付近の低分子化されたバンドは、酵素抗体法で認められないことから、BSAの分解物と考えられた。以上のことから、タンパク質存在下では、キモトリプシンによるTAIの分解が抑えられることが確認された。

インゲンマメ α -アミラーゼインヒビターの消化酵素に対する安定性についての報告¹⁹⁾²⁰⁾は少ない。同じくトラマメ α -アミラーゼインヒビターの消化性を調べた吉川らの報告²¹⁾によると、ペプシン及びトリプシン消化に対して安定であるが、キモトリプシン消化には不安定であり、我々の結果と同じであった。本研究では、TAIをBSA存在下でキモトリプシン消化したところ、インヒビター分子の分解が抑えられたことから、インヒビターを食品タンパク質と共に摂取することで、キモトリプシン消化からある程度保護されることが示唆された。

要 約

トラマメ α -アミラーゼインヒビター (TAI)の各種消化酵素に対する安定性をインヒビター活性、SDS-PAGE及びウエスタンブロッティング後の酵素抗体法を用いて検討した。

TAIは、ペプシン消化、トリプシン消化に対して強い抵抗性を示し、24時間消化後もインヒビター活性の低下は認められず、SDS-PAGEにおいてもインヒビターのバンドは明瞭であった。一方、キモトリプシン消化に対しては、不安定であり消化を受

けた。しかし、BSA存在下でのキモトリプシン消化では、インヒビター活性はかなりの程度保持され、またウエスタンブロッティング後の酵素抗体法により、インヒビター分子の分解も抑えられることが確認された。

以上のことから本インヒビターは、食品タンパク質と共に摂取することで、キモトリプシン消化からある程度保護されることが示唆された。

文 献

- 1) Jaffe, W. G., Moreno, R., and Wallis, V., *Nutr. Rept. Intern.*, **7**, 169-174 (1973)
- 2) Marshall, J. J., *Am. Chem. Soc. Symp.*, **15**, 244-266 (1975)
- 3) Powers, J. R. and Whitaker, J. R., *J. Food Biochem.*, **1**, 217-238 (1977)
- 4) Pick, K. H. and Wöber, G., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem.*, **359**, 1371-1377 (1978)
- 5) Lajolo, F. M. and Finar-de-Filho, F., *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 132-138 (1985)
- 6) Kotaru, M., Saito, K., Yoshikawa, H., Ikeuchi, T., and Ibuki, F., *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 577-578 (1987)
- 7) Yamaguchi, H., *J. Biochem.*, **110**, 785-789 (1991)
- 8) 澤田小百合, 金森正雄, 武庫川女子大紀要(自然科学), **40**, 39-43 (1992)
- 9) Puls, W. and Keup, U., *Diabetologia*, **9**, 97-102 (1973)
- 10) Layer, P., Carlson, G.L., and Dimagno, E.P., *Gastroenterology*, **88**, 1895-1902 (1985)
- 11) 横田 隆, 桐原 修, 大石一二三, 谷 久典, 渡辺乾二, 大綱 弘, 日本栄養・食糧学会誌, **47**, 341-348 (1994)
- 12) Sawada, S., Takeda, Y., and Tashiro, M., *J. Protein Chem.*, **21**, 9-17 (2002)
- 13) 澤田小百合, 竹田由里, 金森正雄, 田代 操, 武庫川女子大学紀要, **50**, 85-89 (2002)
- 14) 澤田小百合, 弥永由里, 田代 操, 日本食品科学工学会誌, **53**, 534-541 (2006)
- 15) 澤田小百合, 竹田由里, 山口美子, 金森正雄, 田代 操, 武庫川女子大学紀要, **46**, 87-92 (1998)
- 16) Werner, S., and Sebald, W., *Methods of Bio-*

- chemical Analysis*, ed. by Glick, D., John Wiley and Sons, New York, Vol. **27**, pp.109-170 (1981)
- 17) Laemmli U. K., *Nature*, **227**, 680-685 (1970)
- 18) Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 4350-4354 (1979)
- 19) Andriolo, S., Rouanet, J.M., Lafont, J. and Besancon, P., *Nutr. Rep. Int.*, **29**, 149-156(1984).
- 20) Frels, J. M. and Rupnow, J. H., *J. Food Sci.*, **50**, 72-77 (1985)
- 21) 吉川秀樹, 小垂 眞, 田中千栄, 池内常郎, 川端 信, 日本食品科学工学会誌, **47**, 158-162 (2000)